

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：30-11

課題名：小児血液悪性腫瘍克服患者における晩期合併症の予後予測バイオマーカーを探索するためのオミクス解析研究

主任研究者名（所属施設） 国立成育医療研究センター 研究所  
（所属・職名） 社会医学研究部 部長 浦山ケビン

（研究成果の要約）本研究の目的は、小児血液悪性腫瘍克服患者に対する長期的フォローアップ調査が可能な体制基盤の構築、バイオマーカーを用いた晩期合併症発症を予測するための技術および予測モデルの開発である。2019年度は、唾液サンプルの収集を開始し、唾液中細菌叢組成の分析、および患者基本関連情報の収集を行った。90検体収集し、すでに54検体の分析を終えた。その結果、「成長ホルモンの分泌の低下」を抱えている患者は、その症状がない患者と比べ *fusobacteria* の低下が認められた。今後、さらなる詳細な解析を進め、関連性とその他の因子について解明していくことを目指す。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、1) 小児血液悪性腫瘍克服者の臨床情報及び生体試料を退院後も継続的に収集するフォローアップ体制の基礎を構築すること、2) 小児白血病患者が治療中および治療後に経験する免疫機能や内分泌代謝能の異常を含めた有害事象について、細菌叢に現れる早期の変化の特徴を同定すること、3) 複数の次元にわたる情報を包括的に解析する技術を用い、有害事象を引き起こす生物学的メカニズムを明らかにし、より有用な有害事象発症の予測モデルを開発すること、である。

小児血液悪性腫瘍の治療成績は劇的に向上している。生存率の改善により、治療後も長期間にわたる晩期合併症や再発へのフォローアップを必要とする小児がん克服患者への対策が重要になっている。必要時には迅速に最も適切な対応を取ることができる体制が必要である。このようなフォローアップ体制整備の重要性は臨床領域でも強く認識されているが、我が国のフォローアップ体制が確立しているとはいえない。

また、フォローアップで重要となる晩期合併症リスクを早期に予測するため検査についてはいまだ不明な点が多い。また検査は本人に負担がかからず定期的な測定が可能である方法であることが求めるが、技術についても確立されていない。

そこで我々は、晩期合併症発症を早期に診断できる高感度のバイオマーカーが未だ特定されていないことに注目し、発症の可能性を

把握するための指標として用いることとした。また、これらは唾液によって非侵襲的に採取が可能であるため、長期追跡のために小児から繰り返し採取する検体としては最適である。本研究では得られた複数の情報を統合し包括的に解析する手法を用いることで、最も感度・特異度が高い検査指数を算出することが可能となり、より正確かつ迅速に予測可能な有害事象発症の予測モデルを開発できると考えた。

### 2. 研究組織

#### 研究代表者

浦山ケビン（成育医療研究センター 社会医学研究部）

#### 研究協力者

- ・小林しのぶ（成育医療研究センター 社会医学研究部）
- ・森崎菜穂（成育医療研究センター 社会医学研究部）
- ・松本公一（成育医療研究センター 小児がんセンター）
- ・加藤元博（成育医療研究センター 小児がんセンター）
- ・秦健一郎（成育医療研究センター 周産期病態研究部）
- ・大西 英理子（成育医療研究センター 周産期病態研究部）
- ・杉本昌弘（東京医科大学 低侵襲医療開発総合センター）
- ・水谷修紀（東京医科歯科大学）

・真部淳（北海道大学 小児科）

### 3. 研究成果

小児を対象としたマイクロバイオームの評価手法を用いた疫学的研究は非常にまれである。本年度は、研究を進めるにあたり基盤となるリクルートおよび検体管理方法のシステムの確立に重点を置き研究を遂行した。

以下、これまでの進捗報告とする。

#### (1) 多施設型フォローアップ体制の準備

##### (イ) NCCHD におけるリクルート体制

既存コホート（NCCHD Lifetime Cohort）の参加者を対象に、患者から継続的に情報収集が可能となるシステム（追跡、試料および質問票の配布・収集、検体の保管等）を用い、検体収集を行った。

NCCHD Lifetime Cohort 登録者 310 名のうち、本研究の参加基準に該当する 240 名に対し、研究参加の依頼案内を送付した。122 名より参加希望の意思を受け、研究資材等のパッケージ（研究説明書、同意書、検体キット）を送付した。最終的に同意を取得し、収集できた検体数は 90 件であった。なお、リクルートおよび検体収集は 2 期に分け実施した。

	第 1 期	第 2 期	合計
実施期間	2019 年 5 月 ～8 月	2020 年 1 月 ～3 月	—
研究参加依頼発送数	141 件	99 件	240 件
パッケージ送付数	67 件	55 件	122 件
同意取得数	54 件	36 件	90 件
検体収集数	54 件	36 件	90 件

##### (ロ) NCCHD 以外の施設における体制整備

多施設型フォローアップ体制構築を目指し、対象施設を関東エリアに拡大しデータ収集を行うことを計画し、東京小児がんグループ（TCCSG）の協力が委員会で承認を得た。しかし、TCCSG のコホートに本研究に関連し

たバイオマーカー研究を実装する段階に到達することはできなかった。だが、将来の研究を推進させるための重要な基盤を構築するきっかけとなっている。

#### (2) マイクロバイオーム分析・評価方法の決定

2019 年度は、メタ 16S 解析を行うための研究準備を整え、収集できた検体について細菌叢解析を試みた。

解析に先立ち、OMNIgene Oral (OM-501) の保存溶媒から唾液中の細菌 DNA を抽出する方法を検討した。使用報告のある QIAamp PowerFecal DNA Kit (QIAGEN) に加え、体液や羊水検体でも実績のある QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を試みた。その結果、DNA 収量が比して多く得られた後者の使用を決定した。DNA 収量は多様性の検出に影響を与える可能性が考えられる。さらに、収集した唾液 54 検体について、16S Metagenomic Sequencing Library を作製した。16S rRNA 遺伝子の可変領域(V1-2) を、ユニバーサルプライマー（27Fmod と 338R）を使って PCR 増幅したのち、イルミナ社のプロトコールに概ね従って作製した。その後、MiSeq sequencing (paired-end, 300 base-pair) を実施し、得られたシークエンスデータを、Miseq Reporter (Illumina) の 16S Metagenomics (GreenGenes をデータベースとする) を用いて解析した。その結果、門レベルにおいて、Firmicutes の存在比および Firmicutes/Bacteroidetes 比が大きい検体は、Proteobacteria の存在比が比して小さい傾向が予測された。また、細菌叢組成が他と大きく異なる 2 検体が存在した。今回使用した Miseq Reporter は、シークエンスクオリティを考慮しないため信憑性に欠けるが、16S 解析は細菌叢と検体の属性との関連を検討する上で興味深い所見が得られるものと期待している。現在、世界で多く利用されるオープンソフトウェアである QIIME を用いて解析する環境を整備中である。また、検体の属性情報を加えて統計解析を行ない、細菌叢組成の特徴との関連を検討する予定である。

#### (3) 成果

##### (イ) 患者の背景

第 1 期に収集した 54 検体に該当する患者の

背景を集計した。男性は 31 名、女性 23 名であり、対象者の年齢は 5-14 歳が 50%を占めていた。診断名は、小児血液疾患が多く (29 名、53%) (Table1)、中でも ALL が最も多かった (Figure1)。

Table 1. 第 1 期 対象者の背景 (2019 年 10 月時点)

Characteristics	n (%)
<b>Gender</b>	
Male	31 (57.4)
Female	23 (42.6)
<b>Age at Survey</b>	
5-9 years	9 (16.7)
10-14 years	18 (33.3)
15-19 years	10 (18.5)
≥20 years	17 (31.5)
<b>Cancer type</b>	
Hematological	29 (53.7)
Solid tumor	15 (27.7)
Other	10 (18.5)

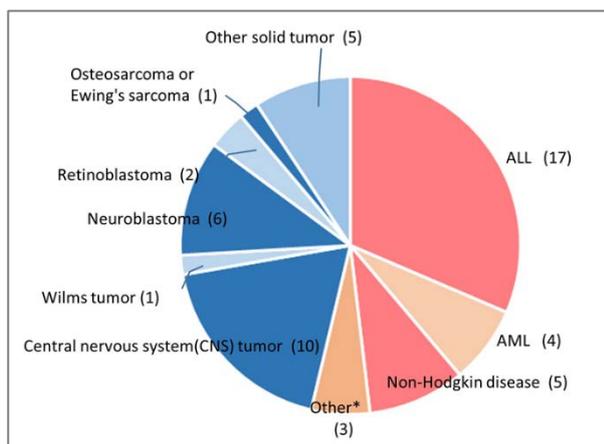


Figure 1. 診断名 (小児がんタイプ)

### (ロ) 健康上の問題 (晩期合併症)

横断的調査(NCCHD Lifetime Cohort)のデータを用い、本研究参加者の経験した、または経験している健康上の問題および晩期合併症

症状について明らかにした。その結果、難聴 (27.8%) と運動機能の問題 (27.8%) が最も多く認められた (Table2)。

Table 2. 経験した健康上の問題

Adverse Health Events	n (%)
皮膚・毛髪に関する問題	10 (18.5)
難聴	15 (27.8)
成長ホルモン低下に関する問題	7 (13.0)
学習・記憶に関する問題	6 (11.1)
運動機能に関する問題	15 (27.8)

### (ハ) 健康上の問題と唾液細菌叢の関連性

唾液細菌叢と健康上の問題との関連性について検討した結果、「成長ホルモン低下の問題」がある患者において「成長ホルモン低下の問題」がない患者と比較して fusobacteria の相対的な減少認めた ( $p < 0.001$ ) (Figure2)。

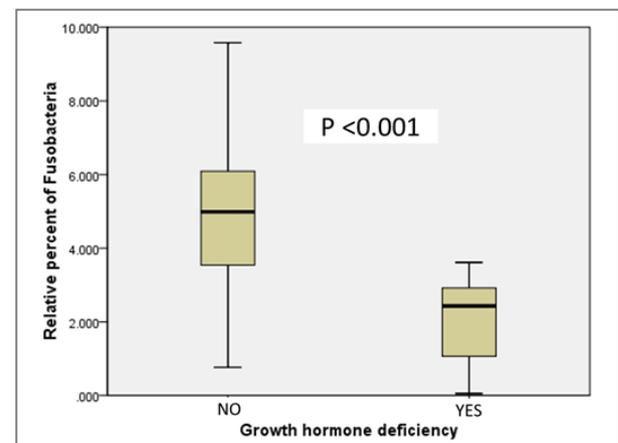


Figure 2. Difference in relative abundance of salivary fusobacteria by growth hormone deficiency status.

現在、患者特性を示す他の変数を用いた変量モデル分析を行っている。これらの結果は、唾液中のマイクロバイオームの組成が成長ホルモンの欠乏に関する有害事象の発症に何かしらの関連性をもたらす因子になっている可能性を示すと推測している。

今後、サンプルサイズを拡大、長期追跡システムへの開発を継続するために、本助成が終

了した後の 2020 年度以降も、本研究を継続できるように研究助成を申請する予定である。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、「ヘルシンキ宣言」、「人を対象とする医学研究に関する倫理指針」に則って行われ、既に国立成育医療研究センターの設置する倫理委員会に研究の申請を行い、病院長の承認を取得して行った。

研究への参加についてのインフォームドコンセントの取得に際しては、プライバシーの保護や安全の確保を含め研究参加者の人権を最大限に尊重して実施した。本研究は未成年を対象とするため、全ての研究参加者に対し、その代諾者による同意書への署名を必要とし、対象者が 16 歳以上の未成年者の場合は、

参加者本人が研究の実施についてその内容に対し十分な判断能力を有すると判断されるため、参加者本人より同意書への署名を取得し、加えて代諾者からも同意書への署名を取得した。7 歳以上 16 歳未満の参加者には、代諾者への説明および同意書への署名の取得に加え、年齢に合わせた説明書と賛意書を用意し、7 歳未満の参加者には、口頭で本人に対しわかりやすい説明を行うよう依頼した。しかしながら、本研究の趣旨を十分に理解した上での同意を求めることは困難であると考えるので、代諾者から同意書への署名を取得することで研究に参加できるものとした。